



PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷:
G01N 33/58, 33/543

(11) Numéro de publication internationale: WO 00/23805

(43) Date de publication internationale: 27 avril 2000 (27.04.00)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE99/00129

(22) Date de dépôt international: 20 octobre 1999 (20.10.99)

(30) Données relatives à la priorité:
9800754 21 octobre 1998 (21.10.98) BE

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): D-TEK
[BE/BE]; Rue Brisselot 11, B-7000 Mons (BE).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): VIGNERON, Alain,
Georges, André [BE/BE]; Rue du Parc 38, B-7331 Bau-
dour (BE). BOUVIER, Jacques, Albert, Georges, Ghislain
[BE/BE]; Rue Petit Fraineux 61, B-4550 Nandrin (BE).

(74) Mandataires: CLAEYS, Pierre etc.; Gevers & Vander
Haeghen, Rue de Livoume 7, B-1060 Bruxelles (BE).

(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD,
SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS,
MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues.

(54) Title: METHOD FOR DETECTING AN ANALYTE AND KIT

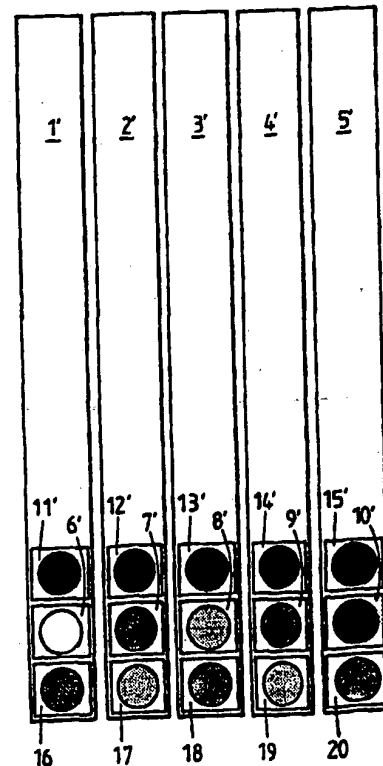
(54) Titre: PROCEDE DE DEPISTAGE D'ANALYTE ET TROUSSE

(57) Abstract

The invention concerns a method for detecting at least an analyte, in a biological fluid sample, which consists in contacting said sample with a ligand, specific at least of one analyte to be detected and fixed on at least a solid support assay zone, marking the bound specific ligand and said at least one analyte, with a tracer, and detecting the tracer as well as contacting said sample with a non-specific ligand, fixed on a zone controlling said solid support threshold and capable of signalling a potential background noise generated over an assay zone by a set of non-specific interacting factors; marking the non-specific ligand and bound interacting factors, with a tracer, and detecting the tracer, the non-specific ligand being fixed on the threshold control zone such that the intensity of the marking signal detected thereon for a biological fluid threshold sample is equal to that of said threshold sample on the assay zone.

(57) Abrégé

Procédé de dépistage d'au moins un analyte, dans un échantillon de fluide biologique, à analyser, comprenant une mise en contact de l'échantillon avec un ligand, spécifique d'au moins un analyte à dépister et fixé sur au moins une zone d'essai d'un support solide, avec marquage du ligand spécifique et dudit au moins un analyte liés, par un traceur, et détection du traceur ainsi qu'une mise en contact de l'échantillon avec un ligand non spécifique, fixé sur une zone de contrôle de seuil du support solide et capable de rendre compte d'un potentiel de bruit de fond engendré sur une zone d'essai par un ensemble de facteurs d'interactions non spécifiques, un marquage du ligand non spécifique et des facteurs d'interactions liés, par un traceur, et une détection du traceur, le ligand non spécifique étant fixé sur la zone de contrôle de seuil de manière que l'intensité de signal de marquage déterminée là pour un échantillon seuil de fluide biologique est égale à celle de cet échantillon seuil sur la zone d'essai.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PROCÉDE DE DÉPISTAGE D'ANALYTE ET TROUSSE

La présente invention est relative à un procédé de dépistage d'au moins un analyte dans un échantillon de fluide biologique

5 à analyser, comprenant :

- une mise en contact de l'échantillon de fluide biologique avec un ligand, qui est spécifique d'au moins un analyte à dépister et qui est fixé sur au moins une zone d'essai d'un support solide,
- une liaison entre ledit au moins un analyte à dépister et le ligand,
- 10 - un marquage du ligand spécifique et dudit au moins un analyte liés, par un traceur, et
- une détection du traceur de marquage sur le ligand spécifique et ledit au moins un analyte liés, avec détermination d'une intensité de signal de marquage,
- 15 - une mise en contact de l'échantillon de fluide biologique avec un ligand non spécifique dudit au moins un analyte, ledit ligand non spécifique étant fixé sur une zone de contrôle du support solide et étant capable de rendre compte d'interactions non spécifiques engendrées par l'échantillon,
- 20 - une adsorption et/ou un accrochage de facteurs d'interactions non spécifiques de l'échantillon sur le ligand non spécifique,
- un marquage du ligand non spécifique et des facteurs d'interactions liés, par un traceur,

- 2 -

- une détection du traceur de marquage sur le ligand non spécifique et les facteurs d'interactions liés, avec détermination d'une intensité de signal de marquage,

On connaît depuis très longtemps des procédés de
5 dépistage (voir par exemple les US-A-4376110, US-A-4703017 et US-A-5028535).

Ce type de dépistage est communément appelé un test "immunodot".

Par support solide il faut entendre dans la présente
10 invention un substrat de préférence en forme de feuille ou membrane, qui peut se présenter par exemple sous la forme d'une carte, d'un ruban ou d'une tigette. On utilise fréquemment une membrane cellulosique, notamment en nitrocellulose ou en esters de cellulose mixtes d'acide
15 nitrique et d'autres acides. Il est évident que des supports solides ayant une autre forme et/ou une autre nature peuvent être envisagés pour la mise en oeuvre du procédé.

Par ligand spécifique, on peut entendre toute molécule pour laquelle il existe une molécule complémentaire spécifique, c'est-à-dire l'analyte à détecter, et qui soit capable de se fixer sur le support solide.
20 Cette dernière fixation peut se faire au travers d'une série d'interactions différentes, telles que des liaisons ioniques, des liaisons covalentes, des interactions hydrophobes, etc...

Par analyte, on comprend toute molécule dont la détection et la mesure de la concentration sont à réaliser et pour laquelle il existe
25 une molécule complémentaire spécifique. Le ligand spécifique et l'analyte peuvent par exemple être stéréocomplémentaires ce qui permet la fixation de l'analyte sur le support solide par l'intermédiaire du ligand facilement accessible à la surface du support solide. On peut envisager, comme analyte, des antigènes, des anticorps, des protéines, des
30 haptènes, des acides nucléiques, etc... Les termes de ligand spécifique

- 3 -

et d'analyte peuvent d'ailleurs s'appliquer à un même type de molécule selon la conception de l'essai.

Par traceur, on peut entendre une molécule spécifique qui est complémentaire de l'analyte et à laquelle est couplé un système permettant sa détection, par exemple une enzyme, un marqueur radioactif, un marqueur fluorescent ou luminescent, une particule colorée (polymère, particules d'or ou de latex), etc..

Les essais faisant appel à un procédé de dépistage tel que décrit ci-dessus peuvent être utilisés pour la détection d'analytes spécifiques dans des fluides biologiques, tels que du sérum, du sang, de l'urine, etc... Des essais immunologiques peuvent être envisagés. Ces essais peuvent être utilisés pour des mesures semi-quantitatives ou quantitatives d'un ou de plusieurs analytes cibles, en une seule opération, avec ou sans utilisation d'une instrumentation spécifique pour la détection d'un signal. Dans ce type de test, l'intensité du signal de marquage est directement proportionnelle à la concentration de l'analyte à détecter dans l'échantillon.

Plusieurs types d'essais immunologiques sur phase solide ont été décrits, dans lesquels la présence ou l'absence d'un analyte dans un échantillon peut être déterminée par une interprétation visuelle des résultats (voir par exemple le US-A-4703017).

La réponse à ces tests se limite cependant à une simple alternative (positif/négatif) et une interprétation semi-quantitative ou quantitative implique d'effectuer en parallèle des essais séparés avec des standards (contrôles) dont la concentration en analyte est connue. La relation entre la réponse observée et la concentration de l'analyte dans l'échantillon peut alors être établie par comparaison avec la ou les références.

On connaît également des procédés de dépistage incluant des systèmes de calibration interne qui évitent l'utilisation de plusieurs

- 4 -

essais pour évaluer la concentration d'un analyte d'un seul échantillon (voir par exemple US-A-5028535).

Dans toute application visant à mesurer une interaction spécifique entre deux ou plusieurs macromolécules organiques, le problème majeur consiste en l'existence d'un bruit de fond résultant d'interférences non spécifiques entre les molécules en présence. Chaque échantillon à analyser contient des facteurs d'interactions non spécifiques qui sont par exemple des molécules interférentes, distinctes de l'analyte à détecter, qui, par leurs propriétés chimiques intrinsèques, possèdent la faculté de se lier non spécifiquement au ligand spécifique (par exemple par accrochage non stéréocomplémentaire ou adsorption) et spécifiquement ou non au traceur. Par exemple, dans un essai de dépistage d'anticorps spécifiques, les immunoglobulines autres que les anticorps spécifiques dirigés contre l'antigène utilisé comme ligand spécifique peuvent représenter un facteur d'interactions non spécifiques.

Par autre facteur d'interactions non spécifiques, on doit aussi comprendre une liaison non spécifique de l'analyte à détecter avec au moins un ligand non spécifique, c'est-à-dire, par accrochage non stéréocomplémentaire ou adsorption. Cela signifie que l'analyte à détecter peut lui aussi participer au bruit de fond à déterminer, au contraire de l'enseignement des brevets US 5,356,782 et EP 0833157.

Par bruit de fond, on doit donc comprendre l'intensité du signal non spécifique résultant d'un ensemble de facteurs d'interactions moléculaires non spécifiques, liés à la nature de l'échantillon (par exemple présence et concentration variables de substances susceptibles de se lier non spécifiquement au ligand spécifique de l'analyte et au traceur, pH, concentration en sels, teneur en lipides variables favorisant les adsorptions intermoléculaires non spécifiques) ou aux conditions dans lesquelles le test est effectué (par exemple température, temps d'incubation, concentrations de l'échantillon et du traceur).

- 5 -

Par potentiel de bruit de fond, on doit par contre comprendre l'intensité maximale de signal non spécifique susceptible d'être engendrée sur une zone d'essai par un échantillon donné, dans des conditions de test données. Par définition, chaque échantillon peut
5 donc être caractérisé par un potentiel de bruit de fond qui lui est propre et intrinsèquement lié.

La mesure du potentiel de bruit de fond donne la valeur seuil de l'intensité de signal, au-dessus de laquelle un échantillon est considéré comme positif et en dessous de laquelle il est considéré
10 comme négatif.

Il va de soi que, chaque échantillon possédant ses propres caractéristiques physico-chimiques, chaque échantillon est susceptible de générer un bruit de fond qui lui est propre et possède intrinsèquement un potentiel de bruit de fond qui lui est propre et peut donc se voir
15 attribuer une valeur seuil qui lui est propre.

Les performances d'un test dépendent de la précision avec laquelle la valeur seuil est mesurée; il importe donc de pouvoir estimer le potentiel de bruit de fond d'un échantillon de manière à obtenir une valeur idéalement corrigée de l'interaction spécifique. Or, dans la plupart
20 des tests actuels de dépistage d'un analyte dans un échantillon de fluide biologique, on détermine de manière générique une valeur seuil unique applicable à l'ensemble des échantillons testés sans tenir compte de la variabilité du bruit de fond lié à chaque échantillon.

Dans un test ELISA par exemple, la détermination d'une valeur seuil (cut-off) de l'intensité du signal, au-dessus de laquelle un échantillon testé est considéré comme positif et en dessous de laquelle il est considéré comme négatif, est effectuée indirectement grâce à au moins un contrôle dont la concentration en analyte est connue, testé en parallèle sur au moins une zone d'essai équivalente mais distincte (par
30 exemple au moins une cuvette voisine dans un test ELISA) avec le ou

les échantillon(s) à analyser. La valeur de seuil est généralement définie par rapport aux valeurs données par une population statistiquement significative d'échantillons considérés comme négatifs pour l'analyte à dépister : un traitement statistique de la distribution de ces valeurs permet de calculer la valeur seuil à utiliser dans l'interprétation des résultats en fonction des performances souhaitées (spécificité et sensibilité du test) (v. par exemple, M.P. BOUNAUD, et J-F. MORIN, Evaluation analytique d'un nouvel immunodosage, Atelier n° 13 du 10e Colloque CORATA, 1993). Bien que ce type d'approche tienne compte de la variabilité de la valeur seuil en fonction des conditions dans lesquelles le test est effectué (les contrôles étant toujours testés en parallèle avec les échantillons dans les mêmes conditions), la variabilité du bruit de fond engendré par les différents échantillons eux-mêmes n'est pas prise en considération (les contrôles ne pouvant pas rendre compte de la présence au sein de chaque échantillon d'un plus ou moins grand nombre de facteurs d'interactions non spécifiques à une plus ou moins grande concentration). Ceci est susceptible de limiter sévèrement la sensibilité du test et de mener à des interprétations faussement négatives pour certains échantillons, particulièrement dans le cas d'une combinaison d'un test hautement spécifique (pour lequel la valeur seuil est nécessairement proche du signal maximal rencontré dans une population négative) et d'un échantillon faiblement positif qui posséderait à fortiori un faible potentiel de bruit de fond.

Le document DE 197 31 465 A1 non publié à la date de priorité de la présente demande de brevet décrit un système de contrôle(s) interne(s) permettant de mesurer indépendamment la valeur d'une ou de plusieurs interactions non spécifiques engendrées par un ou plusieurs facteurs d'interférence propres à chaque échantillon. Néanmoins, la mise en oeuvre de tels contrôles internes implique que les différents facteurs d'interférence soient connus et définis et qu'à chaque

- 7 -

facteur d'interférence défini soit associé un contrôle spécifique distinct. Cette approche permet de mesurer de manière précise l'intensité du signal spécifique par rapport à chacune des interactions non spécifiques qui ont été définies; par contre, le système ne permet pas d'obtenir une

5 évaluation globale, par l'intermédiaire d'un seul et unique contrôle, du bruit de fond global potentiellement engendré par l'ensemble des facteurs d'interférences, connus ou non, présents dans l'échantillon.

Aucun document antérieur n'apporte de solutions à ce problème.

10 Or, sans possibilité d'évaluation d'un seuil réactionnel propre à l'échantillon analysé, l'interprétation des résultats de la plupart des essais immunodot se résume aux deux possibilités suivantes : l'essai est positif si une coloration est visible au niveau de la zone d'essai, et l'essai est négatif en cas d'absence de coloration. Si le

15 système fonctionne effectivement dans les cas où une coloration forte ou une totale absence de coloration est évidente, il est manifeste que l'interprétation des résultats est soumise à la subjectivité du lecteur dans les cas où seule une trace de coloration est visible. Cette trace peut être

20 simplement un bruit de fond.

La présente invention a pour but de résoudre ces problèmes en mettant au point un procédé du type décrit au début, qui permette d'établir un auto-étalonnage intégré à l'essai avec pour chaque échantillon un seuil de réactivité distinct, qui peut être variable en

25 fonction des caractéristiques physico-chimiques de l'échantillon lui-même et des conditions dans lesquelles l'essai est effectué.

On a résolu le problème posé par un procédé tel que décrit au début, ce procédé étant caractérisé en ce que :

au moins un ligand non spécifique est fixé sur une zone de

30 contrôle dite de seuil, en une concentration telle que l'intensité de signal

- 8 -

de marquage déterminée là pour un échantillon seuil de fluide biologique est égale à celle de cet échantillon seuil sur la zone d'essai,

ledit au moins un ligand non spécifique de la zone de contrôle de seuil étant capable de rendre compte d'un potentiel de bruit de fond engendré sur au moins une zone d'essai par un ensemble de facteurs d'interactions non spécifiques, liés à la nature de l'échantillon lui-même et aux conditions dans lesquelles le test est effectué,

et en ce que le procédé comprend une comparaison entre l'intensité du signal de marquage de la zone d'essai et celle de la zone de contrôle de seuil obtenues avec l'échantillon à analyser, celui-ci étant à considérer comme positif lorsque l'intensité du signal de marquage de la zone d'essai est supérieure à celle de la zone de contrôle de seuil.

L'échantillon de fluide biologique appelé échantillon seuil est un des échantillons d'une population statistiquement significative qui, lors d'une analyse de celle-ci par des techniques de référence standards, a été diagnostiqué comme négatif, mais qui dans son application à une zone d'essai d'un procédé de dépistage immunodot donnait une intensité de signal de marquage correspondant à une valeur seuil telle qu'elle peut être calculée statistiquement ou estimée (selon que la lecture se fait respectivement avec ou sans appareil de mesure) par rapport à la distribution des valeurs données par l'ensemble des échantillons négatifs de cette population. Dans le cas où aucun des échantillons négatifs de la population ne donne précisément l'intensité seuil de signal telle que calculée ou estimée, l'échantillon seuil utilisé pour la calibration peut être un échantillon dont l'intensité de signal approche la valeur seuil avec suffisamment d'exactitude, ou encore un calibrateur artificiellement construit (généralement un sérum positif dilué) donnant l'intensité de signal désirée et qui est dès lors considéré comme représentatif de l'échantillon seuil.

L'intensité de signal de marquage obtenue sur la zone de contrôle de seuil avec cet échantillon seuil est donc uniquement due à un bruit de fond, que celui-ci résulte d'interférences extérieures à l'analyte ou de liaisons non spécifiques de l'analyte sur le ligand non spécifique.

- 5 Les expériences ont montré que, lors de l'application du procédé de dépistage suivant l'invention, l'intensité de signal de marquage des échantillons testés sur la zone de contrôle de seuil variait d'échantillon à échantillon et représentait donc une valeur de bruit de fond propre à chaque échantillon. En outre, il est remarquable de constater que pour la
- 10 plupart des échantillons négatifs, l'intensité du signal de marquage sur la zone de contrôle de seuil est supérieure à celle obtenue sur la zone d'essai. Le système rend donc bien compte d'un potentiel de bruit de fond susceptible d'être généré par un échantillon sur une zone d'essai, et non du bruit de fond réellement engendré par cet échantillon sur ladite
- 15 zone d'essai. Par comparaison avec l'intensité de signal de marquage obtenue sur la zone d'essai, on obtient une détermination directe et auto-corrigée du caractère positif ou négatif de l'échantillon, selon que l'intensité sur la zone d'essai est supérieure ou inférieure à l'intensité sur la zone de contrôle de seuil.

- 20 Il faut remarquer que par le procédé suivant l'invention le ligand non spécifique de la zone de contrôle de seuil rend compte d'un potentiel de bruit de fond généré par des interactions non spécifiques engendrées par l'échantillon, interactions qui ne sont ni nécessairement connues ni définies. Un tel dépistage comporte par ailleurs une seule et
- 25 unique zone de contrôle de seuil par échantillon à analyser.

Suivant une forme de réalisation avantageuse de l'invention, le procédé comprend

- une mise en contact de l'échantillon de fluide biologique à analyser avec au moins un ligand qui est non spécifique dudit au moins un

- 10 -

analyte et qui est fixé sur une zone de contrôle dite de réaction du support solide,

- une adsorption et/ou un accrochage de facteurs d'interactions non spécifiques de l'échantillon sur ledit au moins un ligand non spécifique de la zone de contrôle de réaction,
- un marquage dudit au moins un ligand non spécifique de la zone de contrôle de réaction et des facteurs d'interaction liés, par un traceur,
- une détection du traceur de marquage sur ledit au moins un ligand non spécifique de la zone de contrôle de réaction et les facteurs d'interaction liés, avec détermination d'une intensité de signal de marquage,
- ledit au moins un ligand non spécifique de la zone de contrôle de réaction étant fixé sur celle-ci de manière que l'intensité de signal de marquage déterminée soit détectable lorsque le procédé de dépistage a été appliqué d'une manière conforme.

Le procédé permet de s'assurer que la séquence des étapes du test a été respectée et que les différents composants mis en oeuvre sont fonctionnels. L'essai n'est pas valable si une intensité de signal de marquage élevée sur la zone de contrôle de réaction n'apparaît pas. Pour que ledit au moins un ligand non spécifique de la zone de contrôle permette une détection efficace, on peut jouer sur sa concentration ou sur sa nature.

Les expériences ont montré que, comme pour les zones de contrôle de seuil, les zones de contrôle de réaction présentent des intensités de signal de marquage qui sont variables, c'est-à-dire propres à l'échantillon analysé, et cela parce que toutes deux incluent une intensité de signal due au bruit de fond propre à l'échantillon.

Suivant une forme de réalisation perfectionnée de l'invention, le procédé comprend

- 11 -

- une mise en contact de l'échantillon de fluide biologique avec au moins un ligand supplémentaire, qui est spécifique d'au moins un analyte supplémentaire à dépister et qui est fixé sur au moins une zone d'essai supplémentaire du support solide,
- 5 - une liaison entre ledit au moins analyte supplémentaire et son ligand spécifique,
- un marquage dudit au moins un ligand supplémentaire et dudit au moins un analyte supplémentaire liés, par un traceur, et
- une détection du traceur de marquage sur ledit au moins un ligand supplémentaire et ledit au moins un analyte supplémentaire liés, avec détermination d'une intensité de signal de marquage,
- 10 - chaque ligand spécifique supplémentaire étant fixé dans sa zone d'essai supplémentaire en une concentration telle que l'intensité de signal de marquage déterminée là pour un échantillon seuil pour l'analyte supplémentaire correspondant est égale ou inférieure à l'intensité de signal de marquage obtenue dans ladite zone de contrôle de seuil, et
- 15 - une comparaison entre l'intensité du signal de marquage de chaque zone d'essai supplémentaire et celle de la zone de contrôle de seuil, obtenues avec l'échantillon à analyser, celui-ci étant à considérer comme positif pour un analyte supplémentaire lorsque l'intensité du signal de marquage de la zone d'essai supplémentaire correspondant à cet analyte supplémentaire est supérieure à celle de la zone de contrôle de seuil.
- 20

25 Il est ainsi possible d'effectuer la détection de plusieurs analytes différents en se référant à une seule zone de contrôle de seuil pour chaque échantillon.

Ledit au moins un ligand non spécifique fixé sur la zone de contrôle de seuil peut être identique audit au moins un ligand non spécifique fixé sur la zone de contrôle de réaction, mais à une

30

- 12 -

concentration plus faible. Il peut aussi comprendre des substances différentes.

Ledit au moins un ligand non spécifique de contrôle de seuil peut par exemple comprendre :

- 5 - un anticorps, y compris les anticorps monoclonaux, dirigé ou non contre un ou plusieurs antigènes contenus dans l'échantillon, par exemple contre des immunoglobulines d'espèce animale ou humaine,
- un antigène, dirigé ou non contre un ou plusieurs anticorps contenus
10 dans l'échantillon,
- une protéine, comme la protéine A, la protéine G ou la protéine L capable d'accrocher le fragment Fc de certaines immunoglobulines,
- une substance naturelle, comme de l'albumine de sérum de boeuf (BSA) ou les protéines du lait de vache (la caséine par exemple),
15 capable d'accrocher non spécifiquement certains polypeptides par le biais d'interactions protéine-protéine non stéréocomplémentaires,
- une séquence synthétique ou non d'acides aminés, comme par exemple un peptide synthétique, un haptène, de la polylysine, qui est capable d'interactions non spécifiques avec certaines molécules
20 organiques,
- une séquence nucléotidique synthétique ou naturelle, comme par exemple de l'ADN (simple brin ou double brin) ou de l'ARN.

La sélection du ligand ou du mélange de ligands de contrôle de seuil idéal dépend généralement, mais de manière non
25 limitative, du type d'essai, donc de la nature des facteurs d'interactions non spécifiques qui sont susceptibles de se présenter dans ce cas particulier. La concentration idéale du ligand ou du mélange de ligands à appliquer sur la zone de contrôle de seuil est quant à elle définie exclusivement au travers du processus de calibration tel que décrit
30 précédemment.

- 13 -

La présente invention concerne également une trousse de dépistage d'analyte.

Cette trousse comprend :

- un support solide,
- 5 - un ligand qui est spécifique d'au moins un analyte à dépister et est fixé sur au moins une zone d'essai du support solide, et qui, après mise en contact avec l'échantillon à analyser, se lie à ledit au moins un analyte à dépister, en présence de celui-ci,
- un traceur capable de marquer le ligand spécifique et ledit au moins
- 10 un analyte liés, en permettant sa détection avec détermination d'une intensité de signal de marquage,
- un ligand qui est non spécifique dudit au moins un analyte et est fixé sur une zone de contrôle du support solide, et qui, après mise en contact avec l'échantillon à analyser, permet une adsorption et/ou un
- 15 accrochage sur lui de facteurs d'interactions non spécifiques engendrés par l'échantillon, et
- un traceur capable de marquer le ligand non spécifique et les facteurs d'interactions liés, en permettant sa détection avec détermination d'une intensité de signal de marquage,
- 20 cette trousse comportant en outre, suivant l'invention, au moins un ligand non spécifique fixé sur une zone de contrôle dite de seuil du support solide en une concentration telle que l'intensité de signal de marquage, déterminée là pour un échantillon seuil de fluide biologique est égale à celle de cet échantillon seuil sur la zone d'essai, ledit au moins un ligand
- 25 non spécifique de la zone de contrôle de seuil étant capable de rendre compte d'un potentiel de bruit de fond engendré sur au moins une zone d'essai par un ensemble de facteurs d'interactions non spécifiques, liés à la nature de l'échantillon lui-même et aux conditions dans lesquelles le test est effectué,

- 14 -

l'échantillon à analyser étant à considérer comme positif lorsque l'intensité du signal de marquage de la zone d'essai est supérieure à celle de la zone de contrôle de seuil.

Des détails particuliers concernant le procédé de dépistage et la trousse suivant l'invention sont indiqués dans les revendications
5 données ci-après.

D'autres détails et particularités de l'invention ressortiront de la description donnée ci-dessous, avec référence aux dessins annexés.

10 1. Détermination de la concentration du ligand spécifique sur la zone d'essai.

Le ligand spécifique pour l'analyte à détecter est dilué en série généralement dans une solution saline physiologique à dix concentrations variant généralement de 1 à 0,1 µg par millilitre.

15 Chaque dilution est appliquée sous forme de gouttelettes de 1 microlitre sur différentes portions d'une membrane généralement de type nitrocellulosique, l'ensemble constituant une bandelette.

Les bandelettes ainsi préparées sont testées sur une population d'échantillons positifs et négatifs statistiquement significative,
20 selon une procédure courante pour l'homme de métier.

La concentration idéale de ligand spécifique (soit la concentration X) est celle permettant la meilleure discrimination visuelle entre l'échantillon positif donnant l'intensité la plus faible et l'échantillon négatif donnant l'intensité la plus forte.

25 2. Détermination de la concentration dudit au moins un ligand non spécifique sur la zone de contrôle de seuil.

Le ligand spécifique est appliqué, à la concentration déterminée ci-dessus (soit la concentration X), sur une portion de membrane, et cette zone d'essai sert ici de référence.

- 15 -

Ledit au moins un ligand non spécifique est dilué en série et appliqué, comme décrit en 1, sur le reste des portions de membrane libres de la bandelette.

Les bandelettes sont testées sur la même population
5 d'échantillons.

Un échantillon négatif, donnant sur la zone d'essai (qui contient le ligand spécifique à la concentration X) une intensité seuil, telle qu'elle peut être calculée ou estimée selon une procédure courante pour l'homme de métier, est utilisé pour calibrer le seuil : la concentration
10 idéale (soit la concentration Y) du ligand non spécifique est celle donnant, sur la zone de contrôle de seuil, une intensité de coloration identique à celle observée sur la zone d'essai.

L'ensemble des autres échantillons permet de valider le seuil ainsi déterminé : tous les échantillons positifs donnent une intensité
15 supérieure au seuil et tous les échantillons négatifs donnent une intensité inférieure au seuil nonobstant les limites de spécificité et de sensibilité du test telles qu'imposées par la procédure de calcul ou d'estimation de l'intensité seuil. L'intensité du seuil déterminé varie elle-même en fonction des caractéristiques physio-chimiques de chaque
20 échantillon.

3. Essai à plusieurs analytes.

Le développement d'un test à plusieurs analytes implique de suivre dans un premier temps la procédure décrite dans 1 et 2 ci-dessus pour un seul de ces analytes. On détermine alors la
25 concentration idéale dudit au moins un ligand non spécifique (soit la concentration Y) pour cet analyte.

Ledit au moins un ligand non spécifique est appliqué, à la concentration déterminée ci-dessus (soit la concentration Y), sur une portion de membrane, et cette zone sert ici de référence.

- 16 -

Les autres ligands spécifiques des autres analytes sont chacun dilués en série et appliqués, comme décrit sous 1, sur le reste des portions de membrane libres de la bandelette. Les bandelettes sont testées sur une population d'échantillons statistiquement significative pour les autres analytes précités.

Conformément à la procédure décrite en 2, on détermine alors la concentration idéale de chacun des autres ligands spécifiques des autres analytes par rapport audit au moins un ligand non spécifique à la concentration Y, c'est-à-dire en fonction d'un seul et même seuil.

Accessoirement, il est généralement possible d'inclure au test un contrôle de réaction en déposant sur une portion de membrane une concentration dite saturante dudit au moins un ligand non spécifique de contrôle de seuil (concentration généralement 50 à 100 fois supérieure à la concentration utilisée pour le contrôle de seuil).

EXEMPLES

A. Immunodot pour la détection des anticorps anti-pyruvate déshydrogénase (M2).

Immunodot à 3 zones membranaires : 1 contrôle de réaction, 1 contrôle de seuil, 1 zone d'essai.

- Solution de dilution des ligands : NaCl 0,15 M dans H₂O distillée
- Ligand spécifique : Pyruvate déshydrogénase (SIGMA P-7032) à 0,25 mg/ml.
- Ligand non spécifique de contrôle de seuil : immunoglobuline de chèvre anti-molécule entière d'IgG humaine (SIGMA I-1886) à 0,017 mg/ml.
- Ligand non spécifique de contrôle de réaction : immunoglobuline de chèvre anti-molécule entière d'IgG humaine (SIGMA I-1886) à 1 mg/ml.

- 17 -

On dépose 1 µl de chacun des ligands sur la zone membranaire correspondante, puis on laisse sécher 24 heures à température ambiante.

5 B. Immunodot pour la détection des anticorps antinucléaires (ENA).

Immunodot à 8 zones membranaires : 1 contrôle de réaction, 1 contrôle de seuil, 6 zones d'essai pour les anticorps anti-ENA suivants : Sm, RNP, SSA, SSB, JO-1, Scl-70.

- Solution de dilution des ligands : NaCl 0,15 M dans H₂O distillée.
- 10 - Ligands spécifiques : Sm antigène (IMMUNOVISION SMA-3000) à 0,16 mg/ml, RNP antigène (IMMUNOVISION SRC-3000) à 0,19 mg/ml, SSA antigène (IMMUNOVISION SSA-3000) à 0,15 mg/ml, SSB antigène (IMMUNOVISION SSB-3000) à 0,08 mg/ml, JO-1 antigène (IMMUNOVISION JO1-3000) à 0,07 mg/ml, Scl-70 antigène (IMMUNOVISION SCL-3000) à 0,07 mg/ml.
- 15 - Ligand de contrôle de seuil : immunoglobuline de chèvre anti-molécule entière d'IgG humaine (SIGMA I-1886) à 0,022 mg/ml.
- Ligand de contrôle de réaction : immunoglobuline de chèvre anti-molécule entière d'IgG humaine (SIGMA I-1886) à 1 mg/ml.

20 On dépose 1 µl de chacun des ligands sur la zone membranaire correspondante, puis on laisse sécher 24 heures à température ambiante.

C. Immunodot pour la détection des anticorps anti-ADN double brin

25 Immunodot à 3 zones membranaires : 1 contrôle de réaction, 1 contrôle de seuil, 1 zone d'essai.

- Solution de dilution des ligands : NaCl 0,15 M, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5.
- Ligand spécifique : ADN double brin extrait de thymus de veau (SIGMA D4522) à 0,2 mg/ml.

- 18 -

- 5 - Ligands non spécifiques de contrôle de seuil (les concentrations indiquées correspondent aux concentrations finales dans le mélange) : mélange de ADN simple brin (SIGMA D8899) à 10 µg/ml, Histone H1 (IMMUNOVISION HIS-1011) à 2,5 µg/ml, Histone H2a (IMMUNOVISION HIS-1002) à 2,5 µg/ml, Histone H2b (IMMUNOVISION HIS-1013) à 2,5 µg/ml, Histones H3/H4 (IMMUNOVISION HIS-1014) à 2,5 µg/ml, BSA à 5 µg/ml.
- 10 - Ligands non spécifiques de contrôle de réaction (les concentrations indiquées correspondent aux concentrations finales dans le mélange) : mélange d'Immunoglobuline de chèvre anti-molécule entière d'IgG humaine (SIGMA I-1886) à 0,5 mg/ml et d'Immunoglobuline de lapin anti-molécule (µ-chain) d'IgM humaine (SIGMA I-0140) à 0,5 mg/ml.

15 On dépose 1 µl de chacun des ligands ou mélanges de ligands sur la zone membranaire correspondante, puis on laisse sécher 24 heures à température ambiante.

Les figures 1 et 2 annexées illustrent une comparaison d'interprétation des résultats obtenus par un procédé classique de dépistage et par le procédé suivant l'invention.

20 La figure 1 montre cinq bandelettes 1 à 5 courantes dans le commerce sur lesquelles ont été appliquées des gouttes d'un ligand spécifique pour un analyte déterminé dans les zones d'essai 6 à 10. Ces bandelettes sont aussi chacune pourvues d'une zone de contrôle de réaction 11 à 15 où un ligand non spécifique est appliqué à une
25 concentration élevée permettant de contrôler si la réaction a lieu de manière conforme.

Cinq échantillons sont alors analysés quant à l'analyte à détecter suivant une procédure connue en soi, non décrite ici en détail. A la fin de l'essai immunodot une intensité de signal est déterminée dans
30 chaque zone. Dans cet essai il s'agit d'un signal visuel, mais il pourrait

- 19 -

s'agir d'une méthode permettant de fournir un signal à mesurer par radiométrie, fluorescence, luminescence, etc... Comme on peut le constater, les cinq zones de contrôle de réaction 11 à 15 donnent un signal fortement intense, les essais sont donc valables. Il faut noter que
5 les intensités de signal de ces zones 11 à 15 sont légèrement variables entre elles d'une manière impossible à représenter sur le dessin, mais perceptible à l'oeil nu.

La zone 6 permet de déceler clairement que l'échantillon est négatif et les échantillons correspondant aux autres zones d'essai 7
10 à 10 seront probablement déterminés comme positifs par le laborantin.

La figure 2 montre cinq bandelettes 1' à 5' suivant l'invention sur lesquelles se trouvent des zones d'essais 6' à 10' et des zones de contrôle de réaction 11' à 15' qui sont identiques aux zones 6 à 15 des bandelettes 1 à 5 illustrées sur la figure 1 et qui donc donnent la
15 même intensité de signal.

Ces bandelettes 1' à 5' présentent en outre chacune une zone de contrôle de seuil 16 à 20 qui ont été réalisées comme décrit ci-dessus. Les intensités de signal de ces zones sont légèrement variables d'une bandelette à l'autre, ce qui montre que chaque échantillon à
20 analyser présente un potentiel de bruit de fond qui lui est propre.

Il ressort de l'essai illustré, que l'échantillon correspondant à la bandelette 3' est à considérer, d'une manière inattendue, comme négatif. Son intensité de signal est en effet clairement inférieure à celle de la zone de contrôle de seuil. La conclusion que l'on peut tirer de
25 l'essai était imprévisible pour l'homme de métier faisant usage du procédé de dépistage selon la figure 1.

Il doit être entendu que la présente invention n'est en aucune façon limitée aux formes de réalisation décrites ci-dessus et que bien des modifications peuvent y être apportées sans sortir du cadre du
30 présent brevet.

- 20 -

REVENDEICATIONS

1. Procédé de dépistage d'au moins un analyte, dans un échantillon de fluide biologique à analyser, comprenant :

- 5 - une mise en contact de l'échantillon de fluide biologique avec un ligand, qui est spécifique d'au moins un analyte à dépister et qui est fixé sur au moins une zone d'essai d'un support solide,
- 10 - une liaison entre ledit au moins un analyte à dépister et le ligand,
- 10 - un marquage du ligand spécifique et dudit au moins un analyte liés, par un traceur, et
- 10 - une détection du traceur de marquage sur le ligand spécifique et ledit au moins un analyte liés, avec détermination d'une intensité de signal de marquage,
- 15 - une mise en contact de l'échantillon de fluide biologique avec un ligand qui est non spécifique dudit au moins un analyte, est fixé sur une zone de contrôle du support solide et est capable de rendre compte d'interactions non spécifiques engendrées par l'échantillon,
- 15 - une adsorption et/ou un accrochage de facteurs d'interactions non spécifiques de l'échantillon sur le ligand non spécifique,
- 20 - un marquage du ligand non spécifique et des facteurs d'interactions liés, par un traceur,
- 20 - une détection du traceur de marquage sur le ligand non spécifique et les facteurs d'interactions liés, avec détermination d'une intensité de signal de marquage,
- 25 caractérisé en ce que :
 - 25 au moins un ligand non spécifique est fixé sur une zone de contrôle de seuil, en une concentration telle que l'intensité de signal de marquage déterminée là pour un échantillon seuil de fluide biologique est égale à celle de cet échantillon seuil sur la zone d'essai,
 - 30 ledit au moins un ligand non spécifique de la zone de contrôle de seuil étant capable de rendre compte d'un potentiel de bruit de fond

- 21 -

engendré sur au moins une zone d'essai par un ensemble de facteurs d'interactions non spécifiques, liés à la nature de l'échantillon lui-même et aux conditions dans lesquelles le test est effectué,

- et en ce que le procédé comprend une comparaison entre
- 5 l'intensité du signal de marquage de la zone d'essai et celle de la zone de contrôle de seuil obtenues avec l'échantillon à analyser, celui-ci étant à considérer comme positif lorsque l'intensité du signal de marquage de la zone d'essai est supérieure à celle de la zone de contrôle de seuil.

2. Procédé de dépistage d'analyte suivant la revendication

- 10 1, caractérisé en ce qu'il comprend

- une mise en contact de l'échantillon de fluide biologique à analyser avec au moins un ligand qui est non spécifique dudit au moins un analyte et qui est fixé sur une zone de contrôle dite de réaction du support solide,
- 15 - une adsorption et/ou un accrochage de facteurs d'interactions non spécifiques de l'échantillon sur ledit au moins un ligand non spécifique de la zone de contrôle de réaction,
- un marquage dudit au moins un ligand non spécifique de la zone de contrôle de réaction et des facteurs d'interaction liés, par un traceur,
- 20 - une détection du traceur de marquage sur ledit au moins un ligand non spécifique de la zone de contrôle de réaction et les facteurs d'interaction liés, avec détermination d'une intensité de signal de marquage,
- ledit au moins un ligand non spécifique de la zone de contrôle de
- 25 réaction étant fixé sur celle-ci de manière que l'intensité de signal de marquage déterminée soit détectable lorsque le procédé de dépistage a été appliqué d'une manière conforme.

3. Procédé de dépistage suivant l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'il comprend

- 22 -

- une mise en contact de l'échantillon de fluide biologique avec au moins un ligand supplémentaire, qui est spécifique d'au moins un analyte supplémentaire à dépister et qui est fixé sur au moins une zone d'essai supplémentaire du support solide,
- 5 - une liaison entre ledit au moins un analyte supplémentaire et son ligand spécifique,
- un marquage dudit au moins un ligand supplémentaire et dudit au moins un analyte supplémentaire liés, par un traceur, et
- une détection du traceur de marquage sur ledit au moins un ligand supplémentaire et ledit au moins un analyte supplémentaire liés, avec détermination d'une intensité de signal de marquage,
- 10 - chaque ligand spécifique supplémentaire étant fixé dans sa zone d'essai supplémentaire en une concentration telle que l'intensité de signal de marquage déterminée là pour un échantillon seuil pour l'analyte supplémentaire correspondant est égale ou inférieure à l'intensité de signal de marquage obtenue dans ladite zone de contrôle de seuil, et
- 15 - une comparaison entre l'intensité du signal de marquage de chaque zone d'essai supplémentaire et celle de la zone de contrôle de seuil, obtenues avec l'échantillon à analyser, celui-ci étant à considérer comme positif pour un analyte supplémentaire lorsque l'intensité du signal de marquage de la zone d'essai supplémentaire correspondant à cet analyte supplémentaire est supérieure à celle de la zone de contrôle de seuil.
- 20
- 25 4. Procédé suivant l'une des revendications 2 et 3, caractérisé en ce que ledit au moins un ligand non spécifique fixé sur la zone de contrôle de seuil est ledit au moins un ligand non spécifique fixé sur la zone de contrôle de réaction.
- 30 5. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ledit au moins un ligand non spécifique fixé sur

- 23 -

- la zone de contrôle de seuil est choisi parmi le groupe comprenant des anticorps, monoclonaux ou non, dirigés ou non contre un ou plusieurs antigènes contenus dans l'échantillon, des antigènes dirigés ou non contre un ou plusieurs anticorps contenus dans l'échantillon, des protéines synthétiques ou naturelles, telles que de l'albumine de sérum de boeuf, des protéines de lait, des séquences synthétiques ou naturelles d'acides aminés, comme un peptide synthétique, un haptène, de la polylysine, et des séquences nucléotidiques synthétiques ou naturelles, comme de l'ADN (simple brin ou double brin), de l'ARN.
- 5 6. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la détection est effectuée par voie colorimétrique, enzymatique, radiométrique, luminescente.
- 10 7. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que ledit au moins un ligand non spécifique de la zone de contrôle de seuil est susceptible d'établir une liaison non spécifique avec l'analyte à dépister et rend compte, dans ledit potentiel de bruit de fond, d'interactions non spécifiques entre l'analyte à dépister et ledit au moins un ligand non spécifique.
- 15 8. Trousse pour le dépistage d'au moins un analyte dans un échantillon de fluide biologique à analyser, comprenant :
- 20 - un support solide,
- un ligand qui est spécifique d'au moins un analyte à dépister et est fixé sur au moins une zone d'essai du support solide, et qui, après mise en contact avec l'échantillon à analyser, se lie à ledit au moins un analyte à dépister, en présence de celui-ci,
- 25 - un traceur capable de marquer le ligand spécifique et ledit au moins un analyte liés, en permettant sa détection avec détermination d'une intensité de signal de marquage,
- un ligand qui est non spécifique dudit au moins un analyte et est fixé sur une zone de contrôle du support solide, et qui, après mise en
- 30

- 24 -

contact avec l'échantillon à analyser, permet une adsorption et/ou un accrochage sur lui de facteurs d'interactions non spécifiques engendrés par l'échantillon, et

- un traceur capable de marquer le ligand non spécifique et les facteurs d'interactions liés, en permettant sa détection avec détermination d'une intensité de signal de marquage, caractérisé en ce qu'elle comprend au moins un ligand non spécifique fixé sur une zone de contrôle de seuil du support solide en une concentration telle que l'intensité de signal de marquage, déterminée là pour un échantillon seuil de fluide biologique est égale à celle de cet échantillon seuil sur la zone d'essai,

l'échantillon à analyser étant à considérer comme positif lorsque l'intensité du signal de marquage de la zone d'essai est supérieure à celle de la zone de contrôle de seuil.

- 9. Trousse suivant la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre

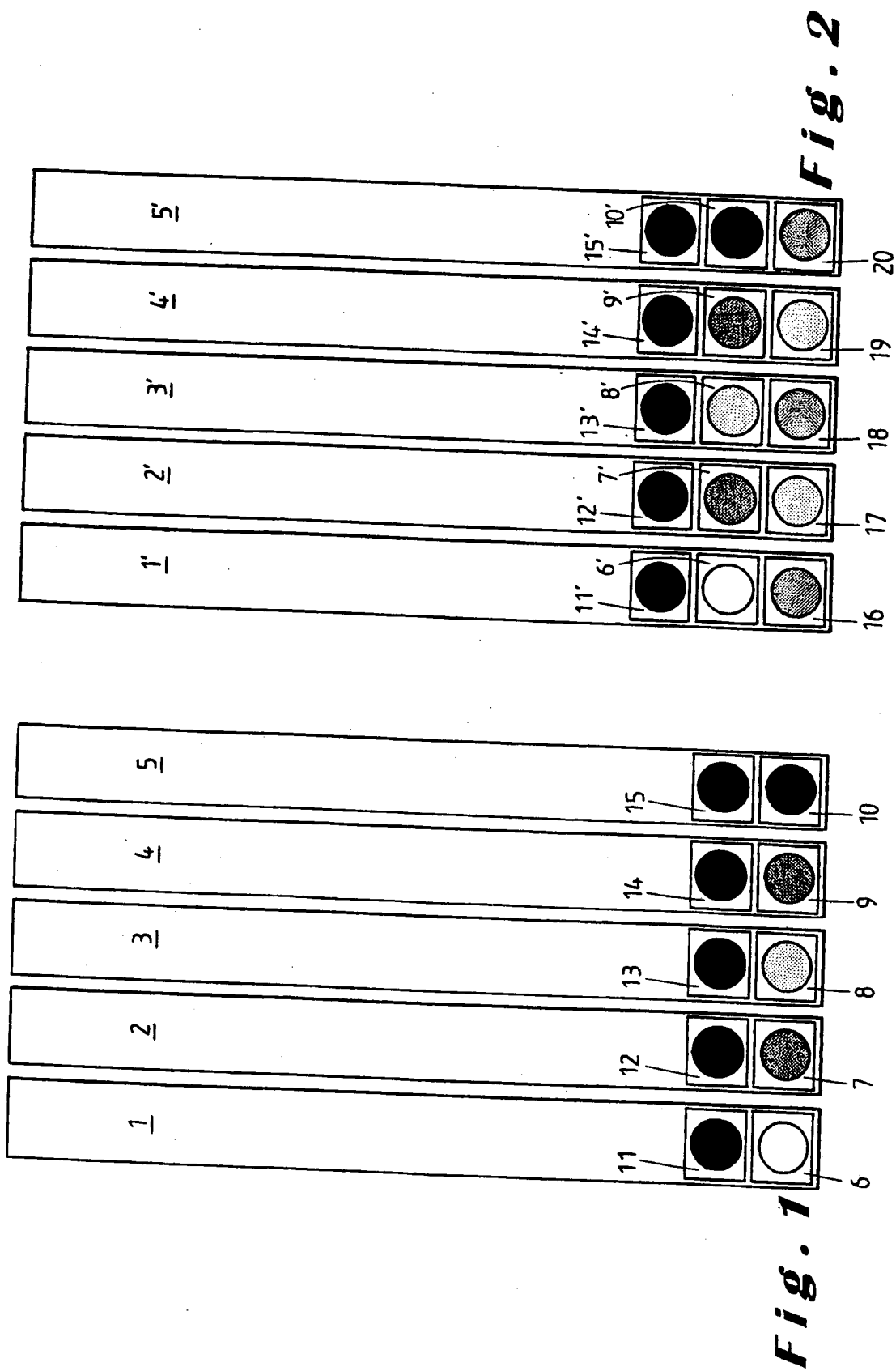
- au moins un ligand qui n'est pas spécifique dudit au moins un analyte à dépister et est fixé sur une zone de contrôle de réaction du support solide, et qui, après mise en contact avec l'échantillon à analyser, permet une adsorption et/ou un accrochage sur lui de facteurs d'interactions non spécifiques engendrés par l'échantillon,
- un traceur capable de marquer le ligand non spécifique et les facteurs d'interactions liés, en permettant sa détection avec détermination d'une intensité de signal de marquage,
- ledit au moins un ligand non spécifique étant fixé sur la zone de contrôle de réaction de manière que l'intensité de signal de marquage déterminée est décelable lorsque le procédé de dépistage a été appliqué d'une manière conforme.

- 10. Trousse suivant l'une ou l'autre des revendications 8 et 9, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre

- 25 -

- au moins un ligand supplémentaire, qui est spécifique d'au moins un analyte supplémentaire à dépister et est fixé sur au moins une zone d'essai supplémentaire du support solide, et qui, après mise en contact avec l'échantillon à analyser, se lie à ledit au moins un analyte supplémentaire, en présence de celui-ci,
- 5 - un traceur capable de marquer ledit au moins un ligand supplémentaire spécifique et ledit au moins un analyte supplémentaire liés, en permettant sa détection avec détermination d'une intensité de signal de marquage,
- 10 - chaque ligand spécifique supplémentaire étant fixé dans sa zone d'essai supplémentaire en une concentration telle que l'intensité de signal de marquage, déterminée là pour un échantillon seuil pour l'analyte supplémentaire correspondant, est égale ou inférieure à l'intensité de signal de marquage obtenue dans ladite zone de
- 15 contrôle de seuil,
- l'échantillon à analyser étant à considérer comme positif lorsque l'intensité du signal de marquage de la zone d'essai supplémentaire correspondant à cet analyte supplémentaire est supérieure à celle de la zone de contrôle de seuil.

20



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/BE 99/00129

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/58 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	DE 197 31 465 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 28 January 1999 (1999-01-28) cited in the application the whole document	1-10
A	EP 0 833 157 A (UNILEVER PLC ; UNILEVER NV (NL)) 1 April 1998 (1998-04-01) cited in the application claims column 1, line 42 - line 50 column 2, line 4 - line 13 column 4, line 4 - line 41 -/-	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"G" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 February 2000

Date of mailing of the international search report

07/03/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Routledge, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/BE 99/00129

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>US 5 356 782 A (MOORMAN DAVID R ET AL) 18 October 1994 (1994-10-18) cited in the application claims column 6, line 30 - line 50 column 8, line 3 - line 30</p>	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. natl Application No

PCT/BE 99/00129

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19731465 A	28-01-1999	AU 9066998 A WO 9905525 A	16-02-1999 04-02-1999
EP 0833157 A	01-04-1998	AU 3684197 A CA 2215042 A JP 10111292 A	02-04-1998 27-03-1998 28-04-1998
US 5356782 A	18-10-1994	EP 0659275 A JP 8501387 T WO 9406012 A	28-06-1995 13-02-1996 17-03-1994

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/BE 99/00129

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N33/58 G01N33/543

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, A	DE 197 31 465 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 28 janvier 1999 (1999-01-28) cité dans la demande le document en entier	1-10
A	EP 0 833 157 A (UNILEVER PLC ; UNILEVER NV (NL)) 1 avril 1998 (1998-04-01) cité dans la demande revendications colonne 1, ligne 42 - ligne 50 colonne 2, ligne 4 - ligne 13 colonne 4, ligne 4 - ligne 41	1-10

—/—

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "S" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

28 février 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

07/03/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Routledge, B

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/BE 99/00129

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>US 5 356 782 A (MOORMAN DAVID R ET AL) 18 octobre 1994 (1994-10-18) cité dans la demande revendications colonne 6, ligne 30 - ligne 50 colonne 8, ligne 3 - ligne 30</p>	1-10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den. Internationale No

PCT/BE 99/00129

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
DE 19731465 A	28-01-1999	AU 9066998 A WO 9905525 A	16-02-1999 04-02-1999
EP 0833157 A	01-04-1998	AU 3684197 A CA 2215042 A JP 10111292 A	02-04-1998 27-03-1998 28-04-1998
US 5356782 A	18-10-1994	EP 0659275 A JP 8501387 T WO 9406012 A	28-06-1995 13-02-1996 17-03-1994

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)